第 43 卷 第 4 期
2000 年 11 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.43, No.4
Nov., 2000

文章编号：0454-6296（2000）04-0346-10

棉铃虫核型多角体病毒与化学杀虫剂和卵磷脂混用的增效作用

万成松*，孙修炼，张光裕

（中国科学院武汉病毒研究所，武汉 430071）

摘要：棉铃虫核型多角体病毒（HaNPV）分别与三氟氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、灭净菊酯、灭多威、辛硫磷、甲基对硫磷和乙酰甲胺磷等化学杀虫剂混合饲喂棉铃虫幼虫，统计致死中浓度 LC_{50}，计算增效比，测定虫体内与抗性有关的三种重要酶：多功能氧化酶（MFO）、羧酸酯酶（CarE）、乙酰胆碱酯酶（AChE）的活性。研究大豆卵磷脂对 HaNPV 致病性的影响。结果表明：HaNPV 与化学杀虫剂混合饲喂抗性棉铃虫，生测统计增效比均大于 1.0，特别是病毒与甲基对硫磷混用，增效比更是达到 3.53，表现出良好的增效作用。混剂感染抗性棉铃虫，虫体内 MFO 的活性比化学杀虫剂单用时降低 3～12 倍，CarE 和 AChE 的活性也比化学杀虫剂单用时低，HaNPV 明显抑制了化学杀虫剂对 MFO 和 CarE 的诱导作用。HaNPV 与大豆卵磷脂混用，提高了 HaNPV 对棉铃虫的感染致死率，缩短了致死中时间（LT_{50}）。

关键词：棉铃虫核型多角体病毒；化学杀虫剂；大豆卵磷脂；增效作用；解毒酶活性
中图分类号：Q936　　**文献标识码**：A

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是一类杂食性、世界性大害虫，由于它对化学杀虫剂抗性的迅速发展，单纯依靠化学防治已很难控制它的发生和为害，棉铃虫核型多角体病毒（HaNPV）杀虫剂是一种杀虫率高，对人畜安全、不污染环境的高效生物农药，目前每年应用面积达 6～7 万公顷[1]。象其它杆状病毒一样，棉铃虫病毒具有杀虫速度慢，宿主范围窄，对高龄幼虫需用量大等缺点。病毒与杀虫剂混用，具有明显的优点，可减少二者的用量，降低成本，减轻对环境的污染，降低害虫抗性的选择压[2～4]，在棉铃虫综合防治中具有重要意义。

棉铃虫对化学杀虫剂敏感性的降低，主要是由于体内解毒酶活性增高，降解多种化学杀虫剂所致[5]。多功能氧化酶（MFO）是抗性昆虫中最重要的酶系，在还原性辅酶 Ⅱ 和 O_2 存在下，能催化各种同源和外源化合物及化学杀虫剂、药物、甾体激素的分解。羧酸酯酶（CarE）催化水解羧酸酯成酸和醇，具有广泛的底物，在有机磷和拟除虫菊酯的抗性中起重要作用，有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂对乙酰胆碱酯酶（AChE）的敏感度降低是昆虫对这些杀虫剂产生抗性的重要机理[6]。另外，磷脂蛋白可提高病毒粒子对宿主中肠微绒毛膜的吸附，增加了 NPV 感染性[7]。

基金项目：中国科学院武汉分院择优支持费课题
* 现工作单位：中国人民解放军第一军医大学微生物教研室，广州，邮编 510515
收稿日期：1997-06-13；修订日期：1999-10-26

我们选用常用的几种化学杀虫剂和卵磷脂与 HaNPV 混合饲喂棉铃虫幼虫，进行生物活性测定和三种主要酶活性测定，探讨病毒与杀虫剂及卵磷脂对 HaNPV 的增效作用和增效机制，无疑在理论上和应用上都具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　棉铃虫敏感品系：湖北国营蒋湖生物农药厂提供，室内饲养达 100 余代。棉铃虫抗性品系：于当年在华北棉田用高压汞灯诱捕成虫产卵孵化。

1.1.2　棉铃虫核型多角体病毒（HaNPV）：选用中国科学院武汉病毒所分离的单核衣壳型棉铃虫核型多角体病毒 HaSNPV-W 株，将 HaNPV 感染致死的棉铃虫尸体加 0.01 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）研磨，3 层纱布过滤，滤液经 900～3 000 r/min 差速离心，反复 3 次，计数 6×10^9 PIB/mL，作为感染母液，供实验用。

1.1.3　杀虫剂：2.5%三氟氯氰菊脂，英国卜内门（ICI）公司；2.5%溴氰菊酯，法国 Roussel/Uclaf 公司；5%氰戊菊酯，日本住友商务株式会社；20%灭净菊酯（复配），中英合资上海中西斯米克药业有限公司；20%灭多威，荆州市沙隆达公司；50%辛硫磷，江苏南通染化厂；50%甲基对硫磷，荆州市沙隆达公司；80%乙酰甲胺磷晶体，荆州市沙隆达公司。

1.1.4　试剂：碘化硫代乙酰胆碱（ATcH），Fluka 公司；5，5′-二硫 2-硝基苯甲酸（DTNB），Fluka 公司；毒扁豆碱，Fluka 公司；对硝基茴香醚（NTAN），Fluka 公司；固蓝 B 盐，Fluka 公司；还原性辅酶 Ⅱ（NADPH），Sigma 公司；对基苯酚（NTPH），北京星光化工厂；α-醋酸萘酯（α-NA），北京通县育才精细化工厂；α-萘酚，上海亭新化工厂；牛血清白蛋白（BSA）。

1.2　棉铃虫饲养方法

参考张光裕等[8]方法，虫卵 2%甲醛表面消毒，漂洗 3 次，凉干，人工饲料单瓶饲养，(27±1)℃光照培养箱培养（12L∶12D）。

1.3　生物活性测定

致死中浓度（LC_{50}）生物测定法[9]：选大小一致 4 天虫龄，平均体重（15.1±3.5）mg，每瓶饲养 1 头，人工饲料 1 g/瓶，感染量 50 μL/g 饲料。每个浓度处理 60 头。分设 4 组：病毒组、杀虫剂组、病毒+杀虫剂组、对照组，四组生测同步进行。

病毒组：将病毒（6×10^9 PIB/mL）稀释为以下 5 个浓度：6×10^5、6×10^4、2×10^4、6×10^3、2×10^3 PIB/mL，感染 4 天虫龄幼虫。每天统计死亡数和存活数，共 10 天，求出最终死亡率，转换成机率值，按 Finney[10]的方法求出浓度对数值和死亡机率值的回归方程式，计算出 LC_{50}标准误差及 95%置信限。

化学杀虫剂组：甲基对硫磷、灭多威、三氟氯氰菊酯、乙酰甲胺磷、溴氰菊酯等杀虫剂稀释 1×10^4、2×10^4、4×10^4、8×10^4 及 1.6×10^5 倍，依上法分别求各杀虫剂的 LC_{50}、标准误差和 95%置信限。

病毒-化学杀虫剂组：将上述化学杀虫剂与病毒（6×10^9 PIB/mL）按 1∶1 混合后，分别稀释 1×10^4、1×10^5、3×10^5、1×10^6、3×10^6 倍，感染 4 天虫龄幼虫，依上法分别求各混

剂的 LC_{50}、标准误差及95%置信限。

对照组：用不含任何化学杀虫剂和病毒的新鲜人工饲料饲养。

1.4 酶活测定

1.4.1 棉铃虫的处理：大田收集抗性棉铃虫成虫，产卵孵化，人工饲料喂到3龄。分设四组：对照组，20头，无病毒饲料饲喂；病毒组，20头，1.6×10^5 PIB/g 的HaNPV感染4天；化学杀虫剂组，20头，前3天无毒饲养，第4天用混有化学杀虫剂（浓度分别为 4.16×10^{-3} mg/L 三氟氯氰菊酯、4.16×10^{-3} mg/L 灭多威、1.67×10^{-5} mg/L 甲基对硫磷、1.67×10^{-5} mg/L 辛硫磷和 2.67×10^{-5} mg/L 乙酰甲胺磷）的饲料喂养；病毒+化学杀虫剂组，20头，前3天用含有 1.6×10^5 PIB/g HaNPV 的饲料饲喂，第4天加化学杀虫剂喂养（浓度同上）。第5天（6龄虫）取样制备酶源。

1.4.2 酶源的制备[12]：多功能氧化酶（MFO）：取15头6龄幼虫中肠，0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.8）漂洗2次，加2 mL缓冲液冰浴匀浆，4℃ 3 000 r/min 离心10 min，上清液即为酶源。−20℃保存。

羧酸酯酶（CarE）：取10头整体6龄幼虫，用0.1 mol/L PBS（pH7.0）漂洗2次，加2 mL缓冲液冰浴匀浆，4℃ 4 500 r/min 离心15 min，上清液即为酶源。−20℃保存。

乙酰胆碱酯酶（AChE）：各处理6龄幼虫15头，取头部，用0.1 mol/L PBS（pH8.0）漂洗2次，加2 mL缓冲液冰浴匀浆，于4℃ 4 000 r/min 离心20 min，上清液即为酶源。−20℃保存。

1.4.3 酶活性测定：MFO活性的测定，参考袁家珪等[12]方法，反应物为0.1 mol/L NTAN 10 μL，0.002 mol/L NADPH 0.5 mL，酶液0.5 mL，加0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液（pH7.8）至3 mL，30℃水浴30 min，加1 mol/L HCl溶液1 mL终止反应，测 OD_{400} 值。对照以缓冲液取代NADPH。标准曲线用对硝基苯酚制作。生成物浓度的计算公式为 $\log x=(y-2.546)/0.3295$。

CarE活性测定：参考Van Asperen[13]方法，底物为0.0003 mol/L α-NA（含 1×10^{-5} mol/L 毒扁豆碱2滴）2 mL，酶液0.5 mL，摇匀，25℃水浴25 min，立即加1 mL显色剂（1%固蓝B盐:5%SDS=2:5），静置20 min，测 OD_{600} 值。标准曲线用α-萘酚制作。生成物浓度的计算公式：$\log x=(y-3.7477)/0.3887$。

AChE活性测定：结合Ellman[14]、Gorun[15]两人的方法。反应物为0.075 mol/L ATcH 50 μL，酶液0.2 mL，0.1 mol/ L PBS（pH8.0）1 mL，25℃水浴15 min，加0.01 mol/L DTNB 0.2 mL显色，加毒扁豆碱2滴终止反应，测 OD_{412} 值。无酶水解用PBS代替，以消除自发水解，产物消光系数为 1.36×10^4 $mol^{-1}\cdot cm^{-1}\cdot mL^{-1}$。反应生成物5′-代2′-硝基苯甲酸（TNBA）的计算公式为：生成物的浓度 $=\triangle OD_{412}/(1.36\times10^4\times$ 蛋白 mg/mL × 反应时间)。

1.4.4 蛋白质浓度测定：采用紫外吸收法，以牛血清白蛋白（BSA）作标准曲线。

1.5 卵磷脂对HaNPV增效试验

分三组处理：HaNPV（6×10^3 PIB/mL）、HaNPV（6×10^3 PIB/mL）+卵磷脂（1 mg/mL）、HaNPV（6×10^3 PIB/mL）+卵磷脂（5 mg/mL）。感染4天虫龄棉铃虫幼虫，平均体重（15.1±3.5）mg，感染量为50 μL。每组处理50头，3次重复，清水对照。用常规数理统计方法求每天死亡率、最终死亡率并转换成死亡机率值，求毒力回归方程式，计算 LT_{50}。

2　结果

2.1　HaNPV 与不同化学杀虫剂相互作用的结果

HaNPV（6×10^9 PIB/mL）经系列稀释后，或分别与甲基对硫磷、灭多威、三氟氯氰菊酯、乙酰甲胺磷和溴氰菊酯 1∶1 混合后系列稀释，饲喂棉铃虫幼虫，计算 LC_{50}，得出每组混用的增效比依次为 3.53、1.55、1.55、1.71、1.82，均大于 1.0（表 1）。特别是 HaNPV 与甲基对硫磷混用，增效比为 3.53，增效作用显著。

甲基对硫磷、NPV 单用及 NPV 与甲基对硫磷混剂三组试验表明：前 2 天，甲基对硫磷引起的死亡率高于混剂死亡率，3 天后，混剂引起的死亡率高于化学杀虫剂及病毒单用（图 1）。

HaNPV（6×10^9 PIB/mL）与溴氰菊酯按 86∶14、75∶25、50∶50 三个配比混用，增效比分别为 0.76、0.98、1.83（表 2）。配比不同，混用的效果也不同，分别表现为拮抗、相加和增效作用。

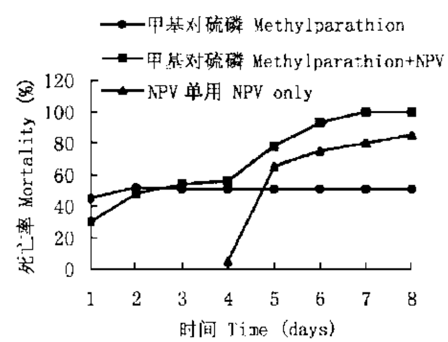


图 1　HaNPV 与甲基对硫磷混合感染 3 龄棉铃虫后的时间-死亡率曲线

Fig. 1　Time-mortality curve of 3rd instar larvae of *H. armigera* infected by HaNPV with methylparathion

表 1　HaNPV 与不同化学杀虫剂混用对棉铃虫幼虫的增效作用

Table 1　Synergism of HaNPV in combinations with different chemical insecticides to cotton bollworm

处理 Treatment	回归方程式 $y=a+bx$	致死中浓度* LC_{50}（PIB/mL）	95%置信限 95% limits	增效比 Synergic ratio
HaNPV	$3.096+0.5x$	6 411（0.213）	4 420～24 499	
甲基对硫磷 Methylparathion	$7.146+1.23x$	0.018（0.0925）(mg/mL)	0.012～0.028	3.53
NPV+甲基对硫磷 NPV+Methylparathion	$2.051+0.905x$	1 815（0.115）	1 078～3 045	
HaNPV	$3.096+0.51x$	6 411（0.213）	4 420～244 993	
灭多威 Methomyl	$8.348+2.28x$	0.034（0.05）(mg/mL)	0.027～0.043	1.55
NPV+灭多威 NPV+Methomyl	$4.317+1.189x$	4 126（0.088）	2 774～6 139	
HaNPV	$-1.1+1.566x$	7 866（0.07）	5 638～10 994	
三氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	$5.746+1.28x$	0.0022（0.012）(mg/mL)	0.0021～0.0023	1.55
NPV+三氟氯氰菊酯 NPV+Cyhalothrin	$-0.286+1.427x$	5 065（0.01）	4 847～5 305	
HaNPV	$-1.1+1.566x$	7 866（0.07）	5 638～10 994	
乙酰甲胺磷 Acephate	$7.01+2x$	0.0989（0.01）(mg/mL)	0.0941～0.10306	1.71
NPV+乙酰甲胺磷 NPV+Acephate	$-0.923+1.617x$	4 598（0.01）	4 400～4 816	
HaNPV	$2.153+0.86x$	2 043（0.01）	1 953～2 137	
溴氰菊酯 Deltamethrin	$6.165+2.37x$	0.00071（0.05）(mg/mL)	0.00056～0.00088	1.82
NPV+溴氰菊酯 NPV+Deltamethrin	$1.678+1.09x$	1 117（0.11）	678～1 831	

* 括号内数字为标准误差 The standard errors are indicated in brackets

表 2 HaNPV 与溴氰菊酯不同配比混用后对棉铃虫幼虫的增效作用

Table 2 Synergism of HaNPV in combinations with deltamethrin in different ratio to cotton bollworm

处理 Treatment	回归方程式 $y=a+bx$	致死中浓度* LC_{50}（PIB/mL）	95%置信限 95% limits	增效比 Synergic ratio
HaNPV	$-0.161+1.17x$	25 767（0.11）	15 781～42 087	0.76
溴氰菊酯 Deltamethrin	$3.935+2.61x$	0.00065（0.04）（mg/mL）	0.00054～0.00078	
混剂 Mixture（86:14）	$-1.519+1.44x$	33 645（0.081）	22 714～49 848	
HaNPV	$2.424+0.695x$	5 086（0.182）	2 229～11 699	
溴氰菊酯 Deltamethrin	$10.612+1.73x$	0.00057（0.104）（mg/mL）	0.00036～0.00092	0.98
混剂 Mixture（75:25）	$0.928+1.096x$	5 169（0.103）	3 237～7 731	
HaNPV	$2.153+0.86x$	2 043（0.01）	1 953～2 174	
溴氰菊酯 Deltamethrin	$2.463+2.37x$	0.00071（0.05）（mg/mL）	0.00056～0.00088	
混剂 Mixture（50:50）	$0.928+1.09x$	1 117（0.11）	678～1 836	1.83

* 括号内数字为标准误差 The standard error are indicated in brackets

2.2 不同化学杀虫剂与病毒混合感染棉铃虫对多功能氧化酶活性的影响

三氟氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、灭净菊酯、灭多威、辛硫磷、甲基对硫磷和乙酰甲胺磷分别与病毒混合感染抗性棉铃虫幼虫，测定虫体内 MFO 的活性（表 3）。单用化学杀

表 3 HaNPV 与化学杀虫剂混用对抗性棉铃虫多功能氧化酶活性的影响

Table 3 Effect of HaNPV in combinations with chemical insecticides on MFO activity in resistant larvae

处 理 Treatment	OD_{400}	蛋白 mg/mL mg protein/mL	酶活 Enzyme activity	相对活性（%） Relative activity
三氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	0.52	33.2	7.12	191.9
三氟氯氰菊酯+NPV Cyhalothrin + NPV	0.17	8.31	2.49	67.1
溴氰菊酯 Deltamethrin	0.38	14.5	6.12	164.9
溴氰菊酯+NPV Deltamethrin + NPV	0.06	8.5	1.08	29.1
氰戊菊酯 Esfinualerate	0.41	11.6	9.44	254.0
氰戊菊酯+NPV Esfinualerate + NPV	0.23	10.8	2.89	77.9
灭净菊酯 Mijinthrin	0.75	39.1	30.25	815.0
灭净菊酯+NPV Mijinthrin + NPV	0.34	27.8	2.42	65.2
灭多威 Methomyl	0.50	14.5	14.60	381.6
灭多威+NPV Methomyl + NPV	0.05	5.82	1.47	39.6
辛硫磷 Phoxim	0.57	14.9	22.50	605.0
辛硫磷+NPV Phoxim + NPV	0.20	12.5	2.10	56.6
甲基对硫磷 Methylparathion	0.69	20.4	38.15	1 028.0
甲基对硫磷+NPV Methylparathion + NPV	0.08	8.1	1.35	36.4
乙酰甲胺磷 Acephate	0.50	20.4	10.11	272.5
乙酰甲胺磷+NPV Acephate+NPV	0.09	6.5	1.70	45.8
NPV	0.15	11.6	1.53	41.2
CK	0.32	15.7	3.71	100.0

注：1. 反应条件为 30℃水浴 30 min Reaction at 30℃ for 30 min;

2. 酶活单位为 $\times 10^{-10}$ mmol/（min·mg） The unit of enzyme activity is $\times 10^{-10}$ mmol /(min·mg)

表 4 同 The same for Table 4

虫剂能诱导幼虫体内 MFO 活性的剧增，相对活性分别达到 191.9%、164.9%、254%、815%、381%、1 028%、272.5%。以甲基对硫磷诱导 MFO 活性增幅最大，相对活性达到 1 028%，说明大田长期使用甲基对硫磷后，棉铃虫已对它产生了很高的抗性。灭净菊酯是拟除虫菊酯与有机磷的复配，对幼虫体内的 MFO 活性也表现出很强的诱导作用（相对活性为 815%），说明大田使用复配制剂害虫的抗性上升很快。HaNPV 与化学杀虫剂混用后能有效地抑制 MFO 活性，一般下降 3～27 倍，其中 HaNPV + 甲基对硫磷使 MFO 活性从甲基对硫磷单用的 1 028%降到 36.4%，下降幅度最大（27.2 倍）。其次为 HaNPV + 灭净菊酯，使 MFO 活性从单用的 815%下降到 65.3%，下降了 11.5 倍。

辛硫磷、甲基对硫磷和灭净菊酯分别与 HaNPV 混合感染棉铃虫敏感品系，测定 MFO 活性，表明化学杀虫剂单用与混用，体内 MFO 活性相差不大（表 4），可见，单用化学杀虫剂并没有诱导棉铃虫敏感品系幼虫体内 MFO 活性增高。

表 4　HaNPV 与三种化学杀虫剂混用对敏感品系棉铃虫 MFO 活性的影响

Table 4　Effect of HaNPV in combinations with chemical insecticides on MFO activity in sensitive larvae

处 理 Treatment	OD_{400}	蛋白 mg/mL mg protein/mL	酶活 Enzyme activity	相对活性（%） Relative activity
灭净菊酯 Mijinthrin	0.14	12.46	1.33	15.40
灭净菊酯 + NPV　Mijinthrin + NPV	0.22	18.28	1.59	18.40
辛硫磷 Phoxim	0.26	22.84	1.68	19.50
辛硫磷 + NPV　Phoxim + NPV	0.11	11.42	1.18	13.67
甲基对硫磷 Methylparathion	0.35	18.69	3.86	44.70
甲基对硫磷 + NPV　Methylparathion + NPV	0.20	13.71	1.78	20.63
NPV	0.39	14.80	4.84	55.90
CK	0.52	27.41	8.63	100.00

2.3　不同化学杀虫剂与病毒混合感染棉铃虫对羧酸酯酶活性的影响

测定不同处理抗性棉铃虫体内羧酸酯酶的活性表明：单用 HaNPV，幼虫体内的 CarE 相对活性下降到 78.75%；单用化学农药，CarE 的相对活性依次升高到 257.8%、111.7%、150%、121.9%、136.7%、116.4%、103.1%、103.1%，但当 HaNPV 与化学杀虫剂混用后，CarE 的活性普遍下降，降低幅度为 1～11 倍（表 5），说明 HaNPV 能使化学杀虫剂对 CarE 活性的诱导作用减弱，使棉铃虫的抗药性水平降低。

2.4　不同化学杀虫剂与病毒混合感染棉铃虫对乙酰胆碱酯酶活性的影响

测定不同处理抗性棉铃虫体内 AChE 活性表明：单用 HaNPV，AChE 活性为 59.5%；单用化学杀虫剂，AChE 相对活性依次为：66.6%、95.2%、87.6%、92.5%、100.6%、46.4%、55.2%、54.6%，下降幅度不大，说明化学杀虫剂对 AChE 的敏感性已下降；但两者混用后，AChE 活性下降程度较大（表 6），说明 HaNPV 与化学杀虫剂混用后，能有效地抑制 AChE 活性。

2.5　卵磷脂对 HaNPV 的增效作用

将 HaNPV（6×10^3 PIB/mL）加不同量的大豆卵磷脂（1 mg/mL 或 5 mg/mL）感染 4 天虫龄棉铃虫幼虫，统计死亡率和 LT_{50}（表 7、图 2）。结果表明，卵磷脂可提高 HaNPV 对棉铃虫的致死率，使死亡率从 HaNPV 单用的 67.6%提高到 72.1%（NPV + 1mg/mL 卵磷脂）

表5 HaNPV与化学杀虫剂混用对抗性棉铃虫羧酸酯酶活性的影响

Table 5 Effect of HaNPV in combinations with chemical insecticides on CarE activity in resistant larvae

处理 Treatment	OD_{400}	蛋白 mg/mL mg protein/mL	酶活 Enzyme activity	相对活性（%） Relative activity
三氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	0.60	9.66	3.30	257.8
三氟氯氰菊酯+NPV Cyhalothrin+NPV	0.29	16.82	0.30	23.4
溴氰菊酯 Deltamethrin	0.48	10.90	1.43	111.7
溴氰菊酯+NPV Deltamethrin+NPV	0.46	13.4	1.04	81.3
氰戊菊酯 Esfinualerate	0.44	6.39	1.94	150.0
氰戊菊酯+NPV Esfinualerate+NPV	0.46	8.11	1.72	134.4
灭净菊酯 Mijinthrin	0.57	17.13	1.56	121.9
灭净菊酯+NPV Mijinthrin+NPV	0.45	16.82	0.78	60.9
灭多威 Methomyl	0.58	16.2	1.75	136.7
灭多威+NPV Methomyl+NPV	0.47	12.15	1.22	95.3
辛硫磷 Phoxim	0.46	9.35	1.49	116.4
辛硫磷+NPV Phoxim+NPV	0.42	8.72	1.26	98.4
甲基对硫磷 Methylparathion	0.50	13.40	1.32	103.1
甲基对硫磷+NPV Methylparathion+NPV	0.47	8.41	1.06	82.8
乙酰甲胺磷 Acephate	0.48	11.84	1.32	103.1
乙酰甲胺磷+NPV Acephate+NPV	0.50	15.26	1.16	90.6
NPV	0.42	10.90	1.01	78.8
CK	0.45	10.28	1.28	100.0

注：1. 反应条件为25℃水浴25 min Reaction at 25℃ for 25 min;
2. 酶活单位为$\times 10^{11}$mmol/(min·mg) The unit of enzyme activity is $\times 10^{11}$ mmol/(min·mg)

表6 HaNPV与化学杀虫剂混用对抗性棉铃虫乙酰胆碱酯酶活性的影响

Table 6 Effect of HaNPV in combinations with chemical insecticides on AChE activity in resistant larvae

处理 Treatment	OD_{400}	蛋白 mg/mL mg protein/mL	酶活 Enzyme activity	相对活性（%） Relative activity
三氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	0.40	3.74	5.24	66.6
三氟氯氰菊酯+NPV Cyhalothrin+NPV	0.39	4.12	4.61	58.6
溴氰菊酯 Deltamethrin	0.35	2.29	7.49	95.2
溴氰菊酯+NPV Deltamethrin+NPV	0.33	4.78	3.38	42.9
氰戊菊酯 Esfinualerate	0.38	2.70	6.90	87.6
氰戊菊酯+NPV Esfinualerate+NPV	0.39	3.53	5.42	68.8
灭净菊酯 Mijinthrin	0.37	2.49	7.28	92.5
灭净菊酯+NPV Mijinthrin+NPV	0.33	2.29	7.06	89.7
灭多威 Methomyl	0.37	2.29	7.92	100.6
灭多威+NPV Methomyl+NPV	0.35	2.70	6.35	80.6
辛硫磷 Phoxim	0.34	4.57	3.65	46.4
辛硫磷+NPV Phoxim+NPV	0.20	2.91	3.37	42.8
甲基对硫磷 Methylparathion	0.35	3.95	4.34	55.2
甲基对硫磷+NPV Methylparathion+NPV	0.22	2.91	3.70	47.0
乙酰甲胺磷 Acephate	0.33	3.73	4.30	54.6
乙酰甲胺磷+NPV Acephate+NPV	0.23	3.12	3.61	45.8
NPV	0.38	3.95	4.72	59.5
CK	0.40	2.49	7.87	100.0

注：1. 反应条件为25℃水浴15 min Reaction at 25℃ for 15 min;
2. 酶活性单位为$\times 10^{7}$ mmol/(min·mg) The unit of enzyme activity is $\times 10^{7}$ mmol/(min·mg)

表 7　大豆卵磷脂对 HaNPV 的增效作用

Table 7　Synergism of HaNPV in combinations with lecithin

处 理 Treatment	最终致死率（%） Mortality	时间-死亡率回归曲线 Time-Probit line	回归系数 r	LT_{50}
NPV only	67.6	$y=0.76+0.62x$	0.95	6.86
NPV + 1 mg/mL 卵磷脂 Lecithin	72.1	$y=1.23+0.56x$	0.97	6.65
NPV + 5 mg/mL 卵磷脂 Lecithin	86.5	$y=0.81+0.7x$	0.97	5.97

注：1. 每个处理 50 头虫，3 次重复　Test was repeated 3 times and 50 larvae per test;
2. 经 F 测验，药间差异显著　There was distinct difference between treatments

和 86.5%（NPV + 5 mg/mL 卵磷脂），LT_{50} 由 6.86 天提前到 6.65 天和 5.97 天，分别缩短了 0.21 天和 0.89 天，说明大豆卵磷脂对 HaNPV 具有增效作用。

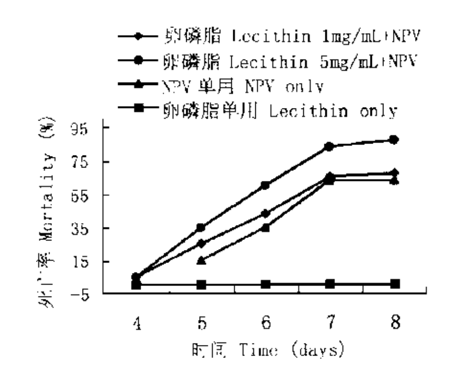


图 2　HaNPV 与卵磷脂混合感染 3 龄棉铃虫的时间-死亡率曲线

Fig. 2　Time-mortality curve of 3rd instar larvae of *H. armigera* infected by HaNPV with lecithin

3　讨论

病毒分别与甲基对硫磷、灭多威、三氟氯氰菊酯、乙酰甲胺磷和溴氰菊酯等混合感染抗性棉铃虫，其增效比均大于 1.0，增效显著，特别是 NPV 与甲基对硫磷混用，增效比达到 3.53，表现出很强的增效作用。这些化学杀虫剂分别属于拟除虫菊酯类、有机磷类、氨基甲酸酯类，不同化学杀虫剂所表现的增效作用不一样。从 NPV 与溴氰菊酯不同配比的试验看出，配比不同，增效程度也不一样，甚至还出现拮抗现象。因此在大田应用中，摸索出二者配比的最佳组合，具有重要的实际意义。

害虫对化学杀虫剂的抗性及化学杀虫剂复配的增效机制，已有报道[16,17]。但化学杀虫剂与 HaNPV 相互作用的增效机制，尚未见报道。为了探讨 HaNPV 与化学杀虫剂混用增效机理，我们从与害虫抗药性密切相关的代谢机理出发，对三种代谢酶 MFO、CarE、AChE 的活性进行测定。结果表明，HaNPV 能使 MFO、CarE、AChE 活性下降。单用化学杀虫剂可使 MFO、CarE 活性升高，表现出诱导作用，但二者混用，HaNPV 抑制了化学杀虫剂对 MFO、CarE 活性的诱导作用，MFO、CarE、AChE 活性显著下降，特别是 HaNPV 与甲基对硫磷混用时 MFO 的活性比甲基对硫磷单用时下降了 27.2 倍，表现出很强的增效作用。此结果与生测结果（增效比 3.53）一致。组织病理研究表明，HaNPV 有在脂肪体、表皮和中肠等组织细胞核内增殖[18]，这些组织器官与化学杀虫剂的渗透、分解代谢和排泄作用有关，参与了各种杀虫剂的解毒作用。在杀虫剂代谢中起中心作用的 MFO 就主要存在于中肠、脂肪体和马氏管中[6,19]。混用增效的可能机制是：病毒感染一方面可破坏虫体表皮、中肠、脂肪体、马

氏管等器官的功能结构，影响杀虫剂的渗透、排泄，另一方面也可使棉铃虫生理代谢紊乱，影响AChE的活性及MFO、CarE对杀虫剂的降解力，抑制了化学杀虫剂对这些酶的诱导作用，降低了棉铃虫对化学杀虫剂抗性的水平。可以认为，棉铃虫抗性的下降是HaNPV与化学杀虫剂相互作用对棉铃虫具有增效潜力的重要原因。

HaNPV与多种化学杀虫剂混合，可提高对棉铃虫的致死率，具有明显的增效作用，还可降低化学杀虫剂对棉铃虫的抗性选择压，延缓抗性的发生，对抗性棉铃虫的综合治理，具有重要意义。

大豆卵磷脂与棉铃虫HaNPV混用，能提高HaNPV的毒力，使死亡率从67.6%提高到72.1%和86.5%，提高了6.6%和28%，LT_{50}缩短了0.21天和0.896天，大豆卵磷脂还是一种天然的乳化剂和混悬稳定剂。由此可见，大豆卵磷脂可考虑作为病毒杀虫剂剂型配制的一种优良辅剂。

参 考 文 献 (References)

[1] 张光裕. 我国棉铃虫病毒杀虫剂的研究开发和应用. 长江流域资源与环境，1994，3(1)：26～29

[2] Pfrimmer T R. *Heliothis* spp. control with pyrethroids，carbamates，organophosphates and biological insecticides. J. Econ. Entomol.，1979，72：593

[3] 张光裕，张友清，葛 洛等. 棉铃虫多角体病毒的生产方法及其在生物防治中的应用. 植物保护学报，1981，8(4)：235～240

[4] 黄 鸿，戴冠群. 菜粉蝶颗粒体病毒与化学杀虫剂混用防治菜青虫及其增效机制研究. 华南农业大学学报，1991，12(2)：96～103

[5] 中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫研究组. 棉花害虫的抗药性懒情防治技术. 北京：科学普及出版社，1993. 16～21

[6] 唐振华. 昆虫抗药性及其治理. 北京：农业出版社，1993. 166，221，261

[7] Yamamoto T，Tanada Y. Acylamines enhance the infection of a baculovirus of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*. J. Invertebr. Pathol.，1980，35：265～268

[8] 张光裕，张友清，葛 洛. 棉铃虫的饲养及其核多角体病毒的增殖. 病毒学集刊，1983，9(4)：309～318

[9] 孙修炼，张光裕. 棉铃虫核型多角体病毒四个分离株的比较研究. 中国病毒学，1994，9(4)：309～318

[10] Finney J. Probit Analysis. 3rd ed，Cambridge University Press. Cambridge，U. K.，1971，Chap. 11

[11] Sun Y P，Johnsin E R. Analysis of joint action of insecticides against house flies. J. Econ. Entomol.，1960，53：887～892

[12] 袁家珪，孙耘芹，冯国蕾等. 家蝇中乙酰胆碱酯酶、羧酸酯酶和多功能氧化酶活性与抗药性的关系. 昆虫学报，1987，30(2)：126

[13] Van Aspere. A study of housefly esterases by mean of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol.，1962，8：401

[14] Ellman G L，Proinov I，Balpescu V *et al*. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol.，1961，7：88～95

[15] Gorun V，Courtney K D. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterase in crude enzymatic preparations. Analytical Biochem.，1978，84：324～326

[16] 李 晶，冯国蕾，龚坤元. 家蝇对二氯苯醚菊酯的抗性及增效磷的增效作用Ⅱ：氧化代谢. 昆虫学报，1989，32(1)：26～31

[17] 张光裕，张友清，龚汉洲等. 棉铃虫核型多角体病毒的生物学特性. 病毒学集刊，1983，3：63～74

Synergism of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in combinations with chemical insecticides and lecithin

WAN Cheng-song，SUN Xiu-lian，ZHANG Guang-yu
（Wuhan Institute of Virology，the Chinese Academy of Sciences，Wuhan，430071，China）

Abstract：Third-instar larvae of *Helicoverpa armigera* were fed on artificial diet mixed with combinations of *H*. *armigera* nucleopolyhedrovirus（HaNPV）and insecticides——cyhalothrin，deltamethrin，esfinualerate，mijinthrin，methomyl，phoxim，methylparathion and acephate respectively. Mortalities were observed，and LC_{50} values and the synergic ratio were determined. The activities of three enzymes（Mixed-function oxidase，MFO；Carboxylesterase，CarE；Acetylcholinesterase，AChE）in relation to the pest resistance to insecticides were also detected. In addition，enhancement of HaNPV infectivity by soybean lecithin was revealed. The results showed that combination of HaNPV and each of the insecticides was more effective than HaNPV or insecticides alone，all the synergic ratios were mere than 1.0，especially synergic ratio of HaNPV-methylparathion treatment arrived at 3.53. The activities of MFO in resistant *H*. *armigera* larvae treated with mixtures of HaNPV and insecticides decreased 3～27 times as compared to insecticide treatments alone. The activities of CarE and AChE in the resistant larvae treated with the mixtures were lower than that with insecticides alone as well. NPV inhibited the increase of MFO and CarE activity induced by insecticides. Lecithin enhanced the infectivity of HaNPV against *H*. *armigera* larvae，the LT_{50} value of HaNPV was shorten when the lecithin was combined.

Key words：*H*. *armigera* nucleopolyhedrovirus；chemical insecticide；soybean lecithin；synergism；enzyme activity